

(5)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 07 c, 103/52

A 61 k, 27/00

DEUTSCHES PATENTAMT



(50)

Deutsche Kl.:

12 q, 6/01

30 h, 2/36

(10)

(11)

(21)

(22)

(43)

# Offenlegungsschrift 2 206826

Aktenzeichen: P 22 06 826.4

Anmeldetag: 9. Februar 1972

Offenlegungstag: 16. August 1973

Ausstellungspriorität: —

(50)

Unionspriorität

(52)

Datum: —

(53)

Land: —

(51)

Aktenzeichen: —

(54)

Bezeichnung:

Intramolekular vernetzte Insulinderivate

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder:

Schering AG, 1000 Berlin und 4619 Bergkamen

Vertreter gem. § 16 PatG —

(72)

Als Erfinder benannt:

Lindsay, David G., Dr., Hove, Sussex (Großbritannien)

DT 2 206 826

ORIGINAL INSPECTED

Intramolekular vernetzte Insulinderivate

Die Erfindung betrifft intramolekular vernetzte Insulinderivate und Arzneimittel auf Basis dieser Insulinderivate sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Die neuen Insulinderivate zeichnen sich durch eine reduzierte immunogene Wirkung (Stimulation der Bildung von Antikörpern) und eine im Vergleich zum Insulin länger anhaltende blutzuckersenkende Wirksamkeit aus. Aufgrund ihrer günstigen biologischen Eigenschaften sind die neuen Insulinderivate für die Behandlung des insulinpflichtigen Diabetes besonders gut geeignet.

Insulin ist als Hormon mit Proteincharakter nur parenteral applizierbar und hat darüber hinaus nur eine kurze Halbwertszeit. Zur therapeutischen Verwendung als Antidiabetikum werden daher Depotpräparate verwendet, die entweder durch Zusatz fremder Stoffe, wie zum Beispiel Protamin oder Surfen<sup>(R)</sup>, oder durch Überführung in die Kristallform, in der Insulin als Hexameres vorliegt, erhalten werden.

Beide Formen des protahiert wirksamen Insulins haben den Nachteil, daß immunogene Eigenschaften verstärkt auftreten, indem die fremden Zusätze im Sinne eines Adjuvans-Effektes und die Kristallform durch die Größe des Moleküls die immunogene Wirkung erhöhen.

- 2 -

309833/1109

Vorstand: Hans-Jürgen Heinsow - Karl Otto Mittelsteinscheldt Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. jur. Edmund v. Schwartzkoppen  
Dr. med. nat. Gerhard Daxen - Dr. Ing. Horst Wolz Sitz der Gesellschaft: Berlin und Langkamen  
Handelsregister AG Charlottenburg 52 HRB 293 u. AG Ramm 5 HRB 71

1 Berlin 65, Mülhlerstraße 170-172  
Postfach 22 - Telefon: (0311) 48 81  
Telex: Berlin West 11 75

2206826  
Peak-Insulin<sup>1</sup>

4

Die Erfindung betrifft somit intramolekular vernetzte Insuline

en Formel I

2206826

worin X eine gegebenenfalls durch eine oder mehrere O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochene Alkylengruppe aus 2 - 8 Gliedern bedeutet.

Die neuen Insulinderivate lassen sich dadurch herstellen, daß man Insulin mit Dicarbonsäurederivaten oder Alkandiisocyanaten umsetzt.

Als Dicarbonsäurederivate kommen Di-N-Hydroxysuccinimidester, Di-p-Nitrophenylester, Bis-(Alkoxycarbonyl-anhydride), Di-halogenide usw. infrage. Gemäß der Bedeutung von X kann die Alkylenkette in den Dicarbonsäurederivaten und in den Diisocyanaten durch O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochen sein.

Die Umsetzung wird in einem polaren Lösungsmittel, insbesondere Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Hexamethylphosphorsäure-triamid, in Gegenwart eines tertiärenamins wie Triäthylamin oder N-Äthylmorpholin in hoher Verdünnung vorgenommen.

Die Reinigung erfolgt nach den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Methoden, wie zum Beispiel durch Chromatographie über Sephadex (R) oder Ionenaustauscher, durch trägerfreie Elektrophorese oder Gegenstromverteilung.

Die Insulinderivate können durch Endgruppenbestimmung (Dansylmethode, DNP-Methode, Edmannabbau), durch Trypsinabbau und

309833/1109

oxydative Sulfitolyse eindeutig charakterisiert werden.

Die neuen Insulinderivate können in Form isotonischer oder hypotonischer Lösungen von etwa 40 IE Wirkstoff/ml als blutzuckersenkende Arzneimittel zur Behandlung des Diabetes angewendet werden.

2206826

Beispiel 1:

1,004 g (175  $\mu$  Mol) Rinderinsulin in 1000 ml Dimethylformamid werden mit 353  $\mu$ l (2,52 m Mol) Triäthylamin und 65,6 mg (210  $\mu$  Mol) Bernsteinsäure-bis-succinimidester versetzt.

Die Reaktionslösung bleibt 15 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Dann wird das Dimethylformamid im Vakuum abdestilliert, der Rückstand gegen 0,01 m Ammoniumhydroxidlösung dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Das Produkt wird unter Verwendung von DEAE-Sephadex in 7 m Harnstoffpuffer chromatographiert.

Man erhält 523 mg Gly <sup>A1</sup>-6-Lys <sup>B29</sup>-succinoyl-insulin.

Papierelektrophorese:

Bedingungen: 2,4 m Ameisensäure/4 m Harnstoff, Anfärbung mit Pauly-Reagenz. Es wurden 300  $\mu$ g aufgetragen. Die Substanz wandert als einheitliche Bande. Ihre relative Wanderungsgeschwindigkeit liegt bei 0,74 (Insulin: 1,00).

309833/1109

Beispiel 2:

2206826

Eine Lösung von 30,7 mg (210  $\mu$  Mol) Adipinsäure in  
3 ml Dimethylformamid und 58,3  $\mu$ l (420  $\mu$  Mol)  
Triäthylamin wird bei  $-10^{\circ}\text{C}$  mit 56,7  $\mu$ l (420  $\mu$  Mol)  
Chlorameisensäureisobutylester versetzt.

Diese Lösung wird bei  $-10^{\circ}\text{C}$  zusammengegeben mit einer  
Lösung von 1,004 g Rinderinsulin (175  $\mu$  Mol) in  
1000 ml Dimethylformamid und 353  $\mu$ l (2,52 m Mol)  
Triäthylamin.

Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden bei Raumtemperatur  
wird wie in Beispiel 1 aufgearbeitet und gereinigt.

Man erhält 490 mg Gly <sup>A1</sup>- $\epsilon$ -Lys <sup>B29</sup>-adipinoyl-insulin.

Beispiel 3:

44,1 mg Suberoyldichlorid (210  $\mu$  Mol) in 3 ml Dimethyl-  
formamid werden mit 1,004 g Rinderinsulin (175  $\mu$  Mol)  
in 1000 ml Dimethylformamid und 411,5  $\mu$ l Triäthylamin  
(2,94 m Mol) versetzt.

Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden wird wie in Beispiel 1  
aufgearbeitet und gereinigt.

Man erhält 520 mg Gly <sup>A1</sup>- $\epsilon$ -Lys <sup>B29</sup>-suberoyl-insulin.

B e i s p i e l 4:

2206826

1,004 g (175  $\mu$  Mol) Rinderinsulin werden in 1000 ml Dimethylformamid gelöst und mit 353  $\mu$ l (2,52 m Mol) Triäthylamin und 35,3 mg (210  $\mu$  Mol) Hexamethylen-diisocyanat versetzt.

Nach 15 Stunden bei Raumtemperatur wird wie in Beispiel 1 aufgearbeitet und gereinigt.

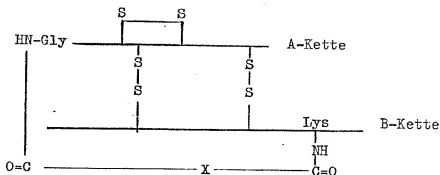
Man erhält 564 mg Gly A<sup>1</sup>- $\epsilon$ -Lys B<sup>29</sup>-hexamethylendi-carbamoyl-insulin.



Patentansprüche:

2206826

- 1.) Intramolekular vernetzte Insuline der allgemeinen Formel I



worin X eine gegebenenfalls durch eine oder mehrere  
O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochene Alkylengruppe aus  
2 - 8 Gliedern bedeutet.

- 2.) Gly A<sup>1</sup>-ε-Lys B<sup>29</sup>-succinoyl-insulin.  
3.) Gly A<sup>1</sup>-ε-Lys B<sup>29</sup>-adipinoyl-insulin.  
4.) Gly A<sup>1</sup>-ε-Lys B<sup>29</sup>-suberoyl-insulin.  
5.) Gly A<sup>1</sup>-ε-Lys B<sup>29</sup>-hexamethylendicarbamoyl-insulin.

309833/1109

2206826

- 6.) Blutzuckersenkendes Arzneimittel mit lang  
anhaltender Wirkung auf Basis einer Verbindung  
gemäß Anspruch 1.
- 7.) Verwendung der Insulinderivate gemäß Anspruch 1  
in einer pharmazeutischen Präparation.
- 8.) Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der  
allgemeinen Formel I, dadurch gekennzeichnet,  
daß man Insulin mit Dicarbonsäurederivaten oder  
Alkandiiisocyanaten umsetzt.

3(9833/1109

2000000/1100



Europäisches  
Patentamt  
European Patent  
Office  
Office européen  
des brevets

<b>Description of DE2206826</b>	<b>Print</b>	<b>Copy</b>	<b>Contact Us</b>	<b>Close</b>
---------------------------------	--------------	-------------	-------------------	--------------

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

Intramolecular crosslinked insulin derivatives the invention relates to of intramolecular crosslinked insulin derivatives and drugs on basis of these insulin derivatives as well as methods to their preparation.

The new insulin derivatives are characterised by a reduced immunogenic effect (stimulation of the formation of antibodies) and a continuous to blood-sugar-lower effectiveness prolonged in the comparison to the insulin. Due to their favorable biological properties the new insulin derivatives for the treatment of the insulin-requiring diabetes are particularly good suitable.

Insulin is only parenteral ones as hormone with a protein character applizierbar and has beyond that only a short half life. The therapeutic use as Antidiabetikum therefore depot preparations will become used, which is present either by addition of foreign fabrics, like for the example protamine or Surfen or by transfer into the crystal form, in the insulins as Hexameres, obtained.

Both forms it protahiert effective insulin has the disadvantage that immunogenic properties amplified arise, as the foreign additions in the sense of an Adjuvans effect and the crystal form increase the immunogenic effect by the size of the molecule.

One has also "mono Compound-insulin" and/or. "Single Poek insulin" proposed, which are free of adäuvanzartig acting proinsulin. In addition, in this form insulin possesses a smaller immunogenic effect, an extension of the biological effect is here only by depot forms possible, whereby then again the immunogenic properties become amplified.

Object of the invention is it to develop insulin derivatives which exhibit a long lasting biological effectiveness without additions.



It now found that intramoleRular crosslinked insulin derivatives, with which the amino group of the glycine remainder in position 1 of the A-chain and the e-Amillogruppe of the Lysinrestes are in position 29 of the B-chain by a chain of 4 to 10 atoms bridged shows no or only a very small reduction of the biological effect, but already with intravenous application 2 to 4 times longer duration of effect has. The duration of effect can become by subcutane application still extended. There this protahierte effect without the conventional, the immunogenic properties strengthening, depot forms achieved will have, the compounds according to invention opposite the commercial insulins major advantages.

The invention relates to thus intramolecular crosslinked insulin of the general  
EMI2.1

EMI2.2

where X one if necessary by or several O-atoms or NH group an interrupted alkylene group from 2 - 8 members means.

The new insulin derivatives can be manufactured by the fact that one converts insulin with dicarbonic acid derivatives or Alkandiliscyanaten.

As dicarbonic acid derivatives DIN hydroxysuccinimide esters, the p-Nitrophenylester come, until (Alkoxy carbonyl anhydrides), Dihalogenide etc. infrage. In accordance with the meaning of X the alkylene chain can be in the dicarbonic acid derivatives and in the diisocyanates by O-atoms or NH group interrupted.

The conversion becomes in a polar solvent, in particular dimethylformamide, a dimethyl sulfoxide or a HexamethylphosphorQaure tri amide, in presence of a tertiary amine such as tri ethyl amine or N-Äthylmo@pholin in high dilution made.

The purification made after in the peptid and protein chemistry the conventional methods, like for the example by chromatography over Sephadex® or ion exchangers, by inertial-free electrophoresis or counter current distribution.

The insulin derivatives can become by Endgruppenbestimmung (Dansyl method, DDS method, Edmannabbau), by Trypsinabbau and oxydative Sulfitololyse unique characterized.

The new insulin derivatives can blood-sugar-lower isotonic or hypotonic solutions of approximately 40 IE Wirkstoff/ml in form as drugs the treatment of the diabetes applied to become.

Bei Beispiel 1: 1,004 g (175 µmol) Rinderinsulin in 1000 ml Dimethylformamid werden mit 353 µl (2,52 mmol) Triäthylamin und 65,6 mg (210 µmol) Bernsteinsäure-bis-succinimidester versetzt.

The reaction solution stops 15 hours with room temperature. Then the dimethylformamide in the vacuo is abdestilliert, the residue against 0,01 m caustic ammonia solution dialyzed and subsequent freeze dried.

The product becomes using DEAE Sephadex in 7 m urea buffer chromatography ore.

One receives 523 mg Gly A1-6-Lys B29-succinoyl-insulin.

Paper electrophoresis: Conditions: 2.4 m Ameisensäure/4 m urea, staining with Pauly reagent. 300 µg applied became. The substance moves as uniform band. Their relative Wanderungsgeschwindigkeit is with 0,74 (insulin: 1,00) Bei Beispiel 2: A solution of 30,7 mg (210 µmol) adipic acid in 3 ml Dimethylformamid and 58.8 l (420 µmol) triethylamine becomes with -10 °C with 56,7 l (420 µmol) Chlorameisensäureisobutylester offset.

This solution becomes with -10 °C together-given with a solution of 1,004 g cattle insulin (175 µmol) in 1000 ml Dimethylformamid and 353 l (2.52 mmol) triethylamine.

After a reaction time of 20 hours with room temperature as in example 1 and purified is regenerated.

One receives 490 mg Gly A1-6-Lys B29-adipinoyl-insulin.

Bei Beispiel 3: 44.1 mg Suberoyldichlorid (210 µmol) in 3 ml dimethylformamides become with 1,004 g cattle insulin (175 µmol) in 1000 ml dimethylformamides and 411,5 l triethylamine (2.94 mmol) offset.

After a reaction time of 5 hours as in example 1 and purified is regenerated.

One receives 520 mg Gly A1-6-Lys B29-suberoyl-insulin.

▲ Beispiel 4: 1.004 g (175 µmol) cattle insulin in 1000 ml dimethylformamides dissolved and with 353 µl (2.52 mmol) triethylamine and 35.3 mg (210 µmol) hexamethylen diisocyanat offset.

After 15 hours with room temperature as in example 1 and purified is regenerated.

One receives 564 mg Gly A1-6-Lys B29-hexamethylendicarbamoyl-insulin.